



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Off nl gungsschrift**
⑩ **DE 199 38 479 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 21/66

②① Aktenzeichen: 199 38 479.7
②② Anmeldetag: 13. 8. 1999
④③ Offenlegungstag: 17. 2. 2000

DE 199 38 479 A 1

③⑩ Unionspriorität:
229557/98 14. 08. 1998 JP

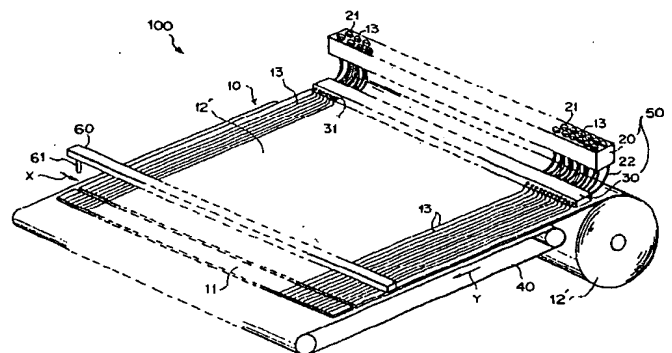
⑦① Anmelder:
Fuji Photo Film Co., Ltd., Minami-ashigara,
Kanagawa, JP

⑦④ Vertreter:
Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

⑦② Erfinder:
Ogura, Nobuhiko, Ashigarakami, Kanagawa, JP

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Prüfstreifen, Verfahren und Vorrichtung zu seiner Herstellung und Verfahren und System zum Lesen des Prüfstreifens
- ⑤⑦ Ein Prüfstreifen (11) für die biologische Analyse einer Probe wird durch ein streifenähnliches Substrat (11) und eine Reihe bekannter spezifischer Bindemittel gebildet, die sich voneinander unterscheiden und in einer Reihe von vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind.



DE 199 38 479 A 1

streifenähnlichen Substrat geschaffen, auf dem mehrere bekannte spezifische Bindemittel angeordnet sind, die sich voneinander unterscheiden und die in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist:

- Aufbringen der bekannten spezifischen Bindemittel auf ein blatt- oder bogenförmiges Substrat in Reihen, die sich in einer ersten Richtung erstrecken und in vorbestimmten Abständen in einer zweiten, zu der ersten Richtung im wesentlichen rechtwinkligen Richtung angeordnet sind, und
- Schneiden des bogenförmigen Substrats mit den darauf angebrachten spezifischen Bindemitteln in der zweiten Richtung, um mehrere Streifen zu erhalten.

Gemäß einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Vorrichtung zum Herstellen eines Prüfstreifens aus einem streifenähnlichen Substrat mit darauf befindlichen mehreren bekannten spezifischen Bindemitteln geschaffen, wobei die Bindemittel sich voneinander unterscheiden und in einer Reihe in vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, wobei die Vorrichtung die Merkmale des Anspruchs 6 aufweist.

Gemäß einem vierten Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Lesen eines Prüfstreifens geschaffen, der ein streifenähnliches Substrat mit darauf befindlichen mehreren bekannten spezifischen Bindemitteln aufweist, die sich voneinander unterscheiden und in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, wobei das Verfahren gemäß diesem vierten Aspekt die im Anspruch 8 angegebenen Merkmale aufweist.

"Kreuzung oder "Hybridisierung" bedeutet allgemein die Bildung von Doppelsträngen zwischen DNA-Fragmenten mit komplementären Basissequenzen, im vorliegenden Zusammenhang soll der Begriff "Kreuzung" jedoch breit verstanden werden, so daß er auch eine spezifische Bindung beinhaltet.

Das Projizieren von Anregungslicht und der Nachweis der Fluoreszenz erfolgen in der Weise, daß man das Anregungslicht dazu bringt, den Prüfstreifen geradlinig in dessen Längsrichtung abzutasten und die von den jeweiligen spezifischen Bindemitteln in der Sequenz emittierte Fluoreszenz erfaßt oder daß man die gesamte Oberfläche des Prüfstreifens gleichmäßig dem Anregungslicht aussetzt, welches sich zumindest in einer Richtung (linear) ausbreitet, und daß man von den einzelnen spezifischen Bindemitteln emittierte Fluoreszenz erfaßt, beispielsweise mit Hilfe eines linearen CCD-Sensors. Allerdings hat die erstgenannte Anordnung gegenüber letzterer Vorteile insofern, als bei letzterer die Belichtungsfläche, auf die das Anregungslicht fällt, aufgeweitet werden muß und der empfindliche Erfassungsbereich des CCD-Sensors verbreitert werden muß, wenn die Länge des Prüfstreifens zunimmt, wodurch die Lesevorrichtung insgesamt baulich größer wird. Das Abtasten des Prüfstreifens mit dem Anregungslicht durch lineares Abtasten kann entweder in der Weise geschehen, daß man das Anregungslicht in Längsrichtung des Prüfstreifens bei stillstehendem Prüfstreifen bewegt oder daß man den Prüfstreifen in dessen Längsrichtung an dem ortsfesten Anregungslicht vorbeitransportiert. Das Anregungslicht kann in Längsrichtung des Prüfstreifens bewegt werden, indem man die Lichtquelle für das Anregungslicht bewegt oder indem man das von der Lichtquelle abgegebene Anregungslicht mit Hilfe eines optischen Abtastsystems bei stillstehender Lichtquelle ablenkt.

Bevorzugt wird allerdings, daß das Anregungslicht den Teststreifen dadurch abtastet, daß der Teststreifen in seiner Längsrichtung transportiert wird, da dies einen einfacheren Arbeitsablauf ermöglicht.

- 5 Das Erfassen der von dem Prüfstreifen bei Anregung mit dem Anregungslicht emittierten Fluoreszenz in bezug auf die Stellen, an denen die Fluoreszenz emittiert wird, ist äquivalent mit dem Ermitteln der Stellen auf dem Prüfstreifen, wo die Fluoreszenz erkannt wird, oder dem Bestimmen der spezifischen Bindemittel, die die Fluoreszenz emittieren. 10 Wenn der Prüfstreifen mit dem Anregungslicht linear abgetastet wird, läßt sich die von dem Prüfstreifen bei Anregung durch das Anregungslicht emittierte Fluoreszenz in Relation zu der Abtaststelle des Anregungslichts erfassen anstatt in bezug auf die Stellen, an denen die Fluoreszenz emittiert wird. 15

Bei dem Verfahren zum Lesen des Prüfstreifens gemäß einem fünften Aspekt der Erfindung werden Substanzen miteinander verglichen, die von Zellen eines Paares unterschiedlicher Probenorganismen abgeleitet sind.

Gemäß einem fünften Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Lesen eines Teststreifens geschaffen, der ein streifenähnliches Substrat aufweist, auf dem sich mehrere bekannte spezifische Bindemittel befinden, die voneinander verschieden sind und in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, wobei das Verfahren die im Anspruch 11 angegebenen Schritte umfaßt.

- Die Fluoreszenzfarbstoffe sind vorzugsweise solche, deren Emissions-Wellenlängenbänder sich nicht gegenseitig überlappen. Allerdings können die Fluoreszenzfarbstoffe auch solche sein, deren Emissions-Wellenlängenbänder sich teilweise überlappen, vorausgesetzt, daß ihre Emissions-Wellenlängenbänder sich nicht in einem Hauptnachweis-Wellenlängenband überlappen. 35

Das die Fluoreszenzfarbstoffe anregende Anregungslicht kann eine Mehrzahl von Lichtstrahlbündeln umfassen, die sich voneinander im Wellenlängenband unterscheiden, oder es kann aus einem einzelnen Lichtstrahlbündel bestehen, wenn die Anregungs-Wellenlängenbänder der Fluoreszenzfarbstoffe eng benachbart sind. Wenn mehrere Anregungslichtstrahlbündel eingesetzt werden, so können diese entweder gleichzeitig projiziert oder nacheinander projiziert werden. 40

Gemäß einem sechsten Aspekt der Erfindung wird ein System zum Durchführen des Verfahrens gemäß dem vierten Aspekt geschaffen.

Gemäß dem sechsten Aspekt der Erfindung geht es also um ein System zum Lesen eines Prüfstreifens mit einem streifenähnlichen Substrat, auf dem sich eine Reihe bekannter spezifischer Bindemittel befindet, die voneinander verschieden sind und in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, wobei das System die Merkmale des Anspruchs 14 aufweist. 55

Im Hinblick auf die Miniaturisierung des Systems ist es bevorzugt, wenn das System mit einer Abtasteinrichtung ausgestattet ist, die das Anregungslicht dazu bringt, den Prüfstreifen linear abzutasten, um dadurch die spezifischen Bindemittel dem Anregungslicht nacheinander auszusetzen, wobei der Fotodetektor dazu dient, die von den jeweiligen spezifischen Bindemitteln in der Reihenfolge emittierte Fluoreszenz zu erfassen. Bevorzugt ist die Abtasteinrichtung so angeordnet und ausgebildet, daß sie das Anregungslicht dazu bringt, den Prüfstreifen dadurch abzutasten, daß der Prüfstreifen in seiner Längsrichtung transportiert wird, da dies einen einfachen Arbeitsablauf garantiert.

Gemäß einem siebten Aspekt der Erfindung geht es um

Die Schneidklinge **61** bewegt sich mit ausreichend hoher Geschwindigkeit relativ zu der Geschwindigkeit, mit der das Substrat **12'** von dem Förderband **40** transportiert wird, so daß das Substrat **12'** im wesentlichen senkrecht zu der Richtung geschnitten wird, in der sich die Reihen von cDNAs **13** erstrecken.

Durch Wiederholen dieser Vorgänge läßt sich innerhalb kurzer Zeit auf einfache Weise eine große Anzahl von Prüfstreifen **11** herstellen.

Im folgenden soll anhand der **Fig. 4** ein System zum Lesen eines Prüfstreifens gemäß einer Ausführungsform der Erfindung erläutert werden. Das in Figur gezeigte System **200** dient zum Durchführen des Verfahrens gemäß dem fünften Aspekt der Erfindung. Das System **200** umfaßt eine Abtasteinrichtung **240**, die einen Prüfstreifen **11** in dessen Längsrichtung transportiert, auf den DNAs aufgebracht wurden, die von einer ersten und einer zweiten Organprobe A (eine normale Person) und B (ein Patient mit einer Erbkrankheit) erhalten wurden, wobei die erste und die zweite Probe mit einem ersten bzw. einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff a bzw. b markiert wurden. Eine erste und eine zweite Anregungslichtquelle **210** und **220** emittieren Anregungslichtstrahlbündel zum Anregen der Fluoreszenzfarbstoffe a bzw. b, wobei eine Optik die Anregungslichtstrahlbündel auf den Prüfstreifen **11** lenkt. Ein Fotodetektor **230** erfaßt die von den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen a und b bei Anregung durch die Anregungslichtstrahlbündel emittierte Fluoreszenz. Ein Filter **260** ermöglicht, daß die von den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen a und b emittierte Fluoreszenz selektiv auf den Fotodetektor **230** fällt. Eine Analyseeinrichtung **250** bestimmt die cDNAs **13'** auf dem Prüfstreifen **11**, mit dem eine Kreuzung der DNAs der ersten und der zweiten Organismusprobe A und B stattgefunden hat, basierend auf dem Ergebnis der Erfassung der Fluoreszenz und den Abtaststellen, die durch die Abtasteinrichtung **240** abgetastet wurden, und wo die Fluoreszenz emittiert wurde. Die Analyseeinrichtung bestimmt den Unterschied zwischen den DNAs der betreffenden Organismusproben A und B anhand der cDNAs **13'**, wobei eine Steuereinheit **217** die Anregungslichtquellen **215** und **220** sowie das Filter **260** umschaltet.

Die Fluoreszenzfarbstoffe a und b sind diejenigen, deren Emissions-Wellenlängenbänder sich nicht gegenseitig überlappen und deren Anregungs-Wellenlängenbänder sich ebenfalls nicht überlappen.

Von Zellen der jeweiligen Probenorganismen A und B entnommene DNAs werden zum Beispiel durch Pipettierung auf die cDNAs **13** auf dem Prüfstreifen **11** aufgebracht, und als Ergebnis kommt es zu einer Kreuzung der cDNAs **13'**, die Basissequenzen komplementär zu jenen der DNAs der Organismusproben A und B aufweisen, mit den DNAs. Dann werden diejenigen cDNAs, die keine Kreuzung mit den DNAs eingegangen sind, mit einer bestimmten Lösung abgespült, wobei solche cDNAs **13'**, die mit mindestens einem der DNAs zur Kreuzung gelangt sind, auf dem Teststreifen **11** verbleiben.

Das von der ersten Anregungslichtquelle **210** emittierte Anregungslicht regt den ersten Fluoreszenzfarbstoff a an, und das Anregungslicht von der zweiten Anregungslichtquelle **220** regt den zweiten Fluoreszenzfarbstoff b an. Die Wellenlängenbänder dieser Anregungslichtstrahlbündel überlappen einander nicht.

Die Abtasteinrichtung **240** enthält einen beweglichen Tisch **241**, auf dem sich der Prüfstreifen **211** befindet, und Antriebswalzen **242** treiben den beweglichen Tisch **241** in Längsrichtung des Prüfstreifens **11** an. Der bewegliche Tisch **241** besteht aus einem Material, welches für die von der ersten und der zweiten Lichtquelle **210** und **220** emittierte

tierte Lichtstrahlbündel transparent ist.

Die Optik, die die Anregungslichtstrahlbündel auf den Prüfstreifen **11** lenkt, enthält einen Spiegel **281**, der den ersten von der ersten Lichtstrahlquelle **210** emittierten Anregungslichtstrahl reflektiert, einen dichroitischen Spiegel **282**, der das erste Anregungslichtstrahlbündel durchläßt und das zweite Anregungslichtstrahlbündel, das von der zweiten Lichtquelle **220** kommt, reflektiert, einen Spiegel **283**, der sowohl den ersten als auch den zweiten Anregungslichtstrahl reflektiert, einen Spiegel **284**, der mit einer kleinen Öffnung versehen ist, durch die hindurch der von dem Spiegel **283** reflektierte Anregungslichtstrahl in Richtung des beweglichen Tisches **241** läuft, während er Fluoreszenz von dem ersten Fluoreszenzfarbstoff a und Fluoreszenz von dem zweiten Fluoreszenzfarbstoff b reflektiert, und eine Kondensorlinse **285**, die den Anregungslichtstrahl, der durch die kleine Öffnung des Spiegels **284** läuft, auf die Oberfläche des Prüfstreifens **211** bündelt.

Das Filter **260** besitzt einen ersten Abschnitt **261**, der nur Fluoreszenz von dem ersten Fluoreszenzfarbstoff durchläßt, und einem zweiten Abschnitt **263**, der ausschließlich die Fluoreszenz von dem zweiten Fluoreszenzfarbstoff b durchläßt.

Im folgenden wird die Arbeitsweise des Lesesystems **200** beschrieben.

Der bewegliche Tisch **241** mit dem darauf befindlichen Prüfstreifen **11** wird in dessen Längsrichtung (Pfeilrichtung X) von den Antriebswalzen **242** bei Steuerung durch die Steuereinheit **270** bewegt.

Gleichzeitig veranlaßt die Steuereinheit **270**, daß die erste Anregungslichtquelle **210** das erste Anregungslichtstrahlbündel emittiert. Das erste Anregungslichtstrahlbündel wird von dem Spiegel **181** reflektiert, durchläuft den dichroitischen Spiegel **282**, wird von dem Spiegel **283** reflektiert und durchsetzt die kleine Öffnung in dem Spiegel **284**. Dann wird das erste Anregungslichtstrahlbündel von der Kondensorlinse **285** auf den Prüfstreifen **100** durch den transparenten beweglichen Tisch **241** hindurch gebündelt.

Da der Prüfstreifen **11** in Pfeilrichtung X bewegt wird, werden die cDNAs **13'** auf dem Prüfstreifen **11** nacheinander dem ersten Anregungslicht ausgesetzt, und von denjenigen cDNAs **13'**, die sich mit den DNAs gekreuzt haben, welche mit dem ersten Fluoreszenzfarbstoff a markiert wurden (DNAs der ersten Organismusprobe A), wird Fluoreszenz emittiert, da von dem ersten Anregungslichtstrahlbündel der erste Fluoreszenzfarbstoff angeregt wird.

Die Fluoreszenz passiert die Kondensorlinse **285**, wird von dem Spiegel **284** reflektiert, durchläuft den ersten Abschnitt **261** des Filters und trifft auf den Fotodetektor **231**. Der Fotodetektor **231** detektiert die Fluoreszenz und gibt Information über die Fluoreszenz an die Analyseeinrichtung **250**. Die Information bezüglich der Stelle der cDNA **13'**, von der die Fluoreszenz stammt, wird ebenfalls in die Analyseeinrichtung **250** eingegeben, und die Fluoreszenz wird in Beziehung gesetzt zu der cDNA **13'**, die Fluoreszenz emittiert hat.

Auf diese Weise werden diejenigen cDNAs **13'** bestimmt, die Fluoreszenz bei Anregung durch das erste Anregungslicht emittieren, das heißt, es werden diejenigen cDNAs **13'** ermittelt, die sich mit den DNAs gekreuzt haben, die in der Zelle des ersten Probenorganismus A verschwunden sind.

Anschließend schaltet die Steuereinheit **270** den ersten Abschnitt **261** des Filters **260** um auf den zweiten Abschnitt **262**, und es erfolgt eine Umschaltung von der ersten Anregungslichtquelle **210** auf die zweite Anregungslichtquelle **220**. Dann findet der gleiche Betrieb statt, wie er oben beschrieben wurde.

Das heißt, der bewegliche Tisch **241** mit dem darauf be-

den und die in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, umfassend folgende Schritte:

Aufbringen einer von einem Probenorganismus abgeleiteten Substanz, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist, auf das Prüfelement (11),

Projizieren von Anregungslicht, welches den Fluoreszenzfarbstoff anregt, auf das Prüfelement, auf das die von dem Probenorganismus abgeleitete Substanz aufgebracht ist, und

Erfassen der Fluoreszenz, die von dem Prüfelement durch Anregung von dem Anregungslicht emittiert wurde, in Relation mit den Stellen, an denen die Fluoreszenz emittiert wurde, um dadurch das oder die spezifischen Bindemittel auf dem Prüfelement zu ermitteln, mit denen sich die von dem Probenorganismus abgeleitete Substanz gekreuzt hat.

9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die spezifischen Bindemittel cDNAs sind und die von einem Organismus abgeleitete Substanz DNA ist.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, bei dem das Anregungslicht dazu gebracht wird, den Prüfstreifen in dessen Längsrichtung linear abzutasten.

11. Verfahren zum Lesen eines Prüfelements, insbesondere Prüfstreifens mit einem streifenähnlichen Substrat, auf dem sich eine Reihe bekannter spezifischer Bindemittel befindet, die sich voneinander unterscheiden und die in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des Substrats angeordnet sind, umfassend folgende Schritte:

Auftragen von Substanzen, die von mindestens einem Paar unterschiedlicher Probenorganismen abgeleitet sind und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, auf das Prüfelement,

Lenken von Anregungslicht, welches die Fluoreszenzfarbstoffe anregt, auf das Prüfelement, auf das von den Probenorganismen abgeleitete Substanzen aufgetragen wurden,

Erfassen von Fluoreszenz, die von dem Prüfelement bei Anregung durch das Anregungslicht emittiert wird, in Relation zu den Stellen, an denen die Fluoreszenz emittiert wird, um dadurch das bzw. die spezifischen Bindemittel auf dem Prüfelement festzustellen, mit denen sich die von jedem der Probenorganismen abgeleitete Substanz gekreuzt hat, und

Ermitteln der Differenz zwischen den von den jeweiligen Probenorganismen abgeleiteten Substanzen durch Vergleichen der spezifischen Bindemittel, mit denen die von den jeweiligen Probenorganismen abgeleiteten Substanzen sich gekreuzt haben.

12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem die spezifischen Bindemittel cDNAs sind und die von einem Organismus abgeleitete Substanz DNA ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, bei dem das Anregungslicht dazu gebracht wird, den Prüfstreifen in dessen Längsrichtung linear abzutasten.

14. System zum Lesen eines Prüfelements, insbesondere Prüfstreifens mit einer streifenähnlichen Substanz, auf dem eine Reihe bekannter spezifischer Bindemittel aufgebracht sind, die sich voneinander unterscheiden und die in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des streifenähnlichen Substrats angeordnet sind, umfassend:

eine Anregungslichtquelle (210, 220), die auf das Prüfelement, auf das eine von einem Probenorganismus abgeleitete Substanz, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde, aufgetragen ist, Anregungslicht projiziert, welches den Fluoreszenzfarbstoff anregt,

einen Fotodetektor (231), der von dem Prüfelement bei Anregung durch das Anregungslicht emittierte Fluoreszenz detektiert, und

eine Analyseeinrichtung (250), die das Ergebnis der Fluoreszenz-Detektion in Beziehung setzt zu den Stellen, an denen die Fluoreszenz emittiert wird, um dadurch das oder die spezifischen Bindemittel auf dem Prüfelement zu bestimmen, mit denen sich die von dem Probenorganismus abgeleitete Substanz gekreuzt hat.

15. System nach Anspruch 14, bei dem die spezifischen Bindemittel cDNAs sind und die von einem Organismus abgeleitete Substanz DNA ist.

16. System nach Anspruch 14 oder 15, umfassend ein Abtastsystem (281–250), welches das Anregungslicht dazu bringt, den Prüfstreifen (11) in dessen Längsrichtung linear abzutasten.

17. System zum Lesen eines Prüfelements, insbesondere Prüfstreifens (11) mit einem streifenähnlichen Substrat, auf dem sich eine Reihe bekannter spezifischer Bindemittel befinden, die sich voneinander unterscheiden und die in einer Reihe mit vorbestimmten Abständen in Längsrichtung des Substrats angeordnet sind, umfassend:

eine Anregungslichtquelle (210, 220), die auf das Prüfelement (11), auf das von mindestens einem Paar verschiedener Probenorganismen (A, B) abgeleitete Substanzen, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, aufgetragen sind, Anregungslicht projiziert, welches die Fluoreszenzfarbstoffe anregt, einen Fotodetektor (231), der von den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen bei Anregung durch das Anregungslicht emittierte Fluoreszenz detektiert, und

eine Analyseeinrichtung (231), die das Ergebnis der Detektion der Fluoreszenz in Beziehung setzt zu den Stellen, an denen die Fluoreszenz emittiert wird, um auf diese Weise das oder die spezifischen Bindemittel auf dem Prüfelement zu bestimmen, mit denen sich die von jedem der Probenorganismen abgeleitete Substanz gekreuzt hat, und die die Differenz zwischen den von den jeweiligen Probenorganismen abgeleiteten Substanzen basierend auf den spezifischen Bindemitteln bestimmt, welche sich mit den von den jeweiligen Probenorganismen abgeleiteten Substanzen gekreuzt haben.

18. System nach Anspruch 17, bei dem die spezifischen Bindemittel cDNAs sind und die von einem Organismus abgeleitete Substanz DNA ist.

19. System nach Anspruch 17 oder 18, umfassend ein Abtastsystem (281–285), welches das Anregungslicht veranlaßt, den Prüfstreifen (11) in dessen Längsrichtung linear abzutasten.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

FIG. 1

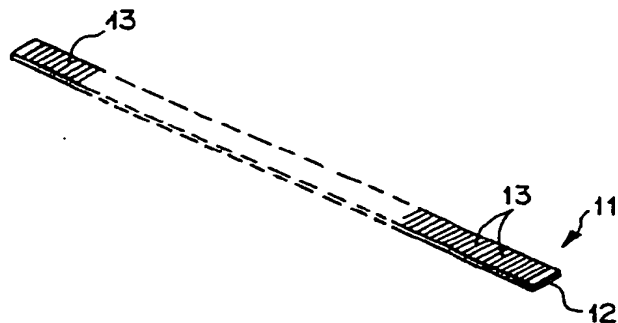
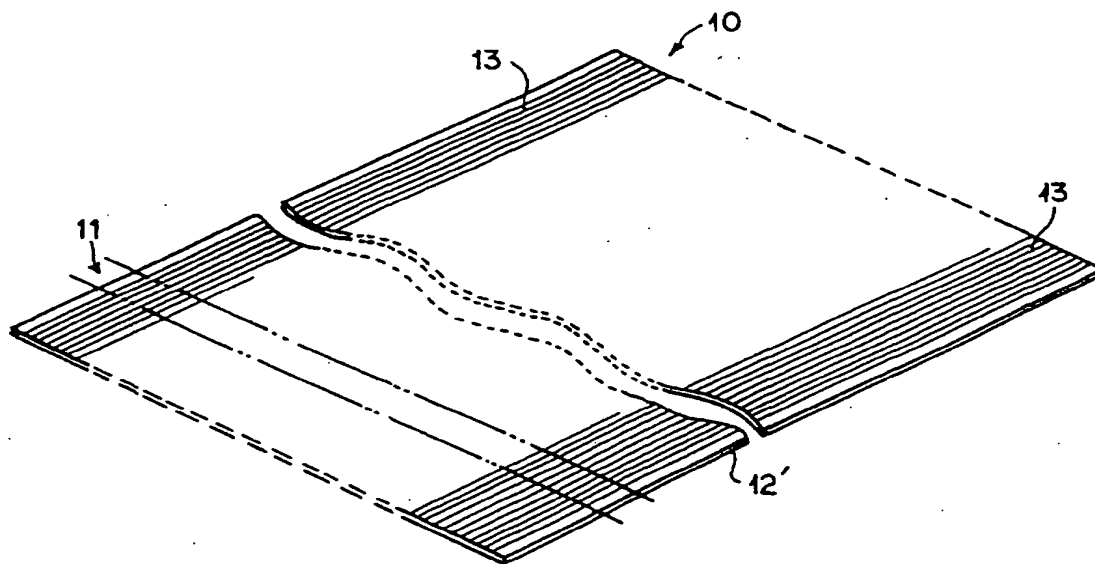


FIG. 2



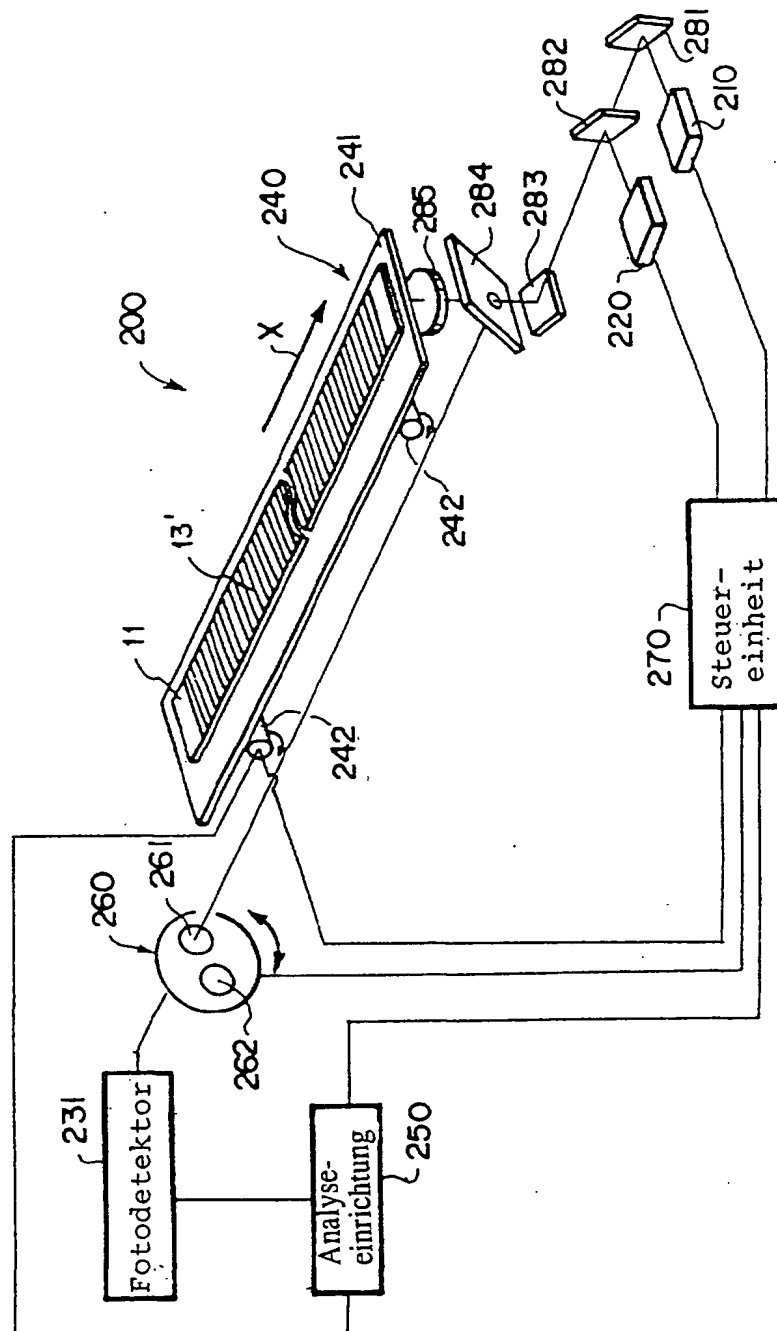


FIG 4